



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

---

**FRAUDE DO LEITE POR ADIÇÃO DE FORMOL: AVALIAÇÃO DE UM  
TESTE RÁPIDO PARA DETECÇÃO E EFEITO SOBRE BACTÉRIAS  
ÁCIDO LÁTICAS**

Dannyele Van Landuyt Moraes

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia de Aguiar Ferreira

BRASÍLIA – DF  
JULHO/2019



DANNYELE VAN LANDUYT MORAIS

---

**FRAUDE DO LEITE POR ADIÇÃO DE FORMOL: AVALIAÇÃO DE UM  
TESTE RÁPIDO PARA DETECÇÃO E EFEITO SOBRE BACTÉRIAS  
ÁCIDO LÁTICAS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação  
em Medicina Veterinária apresentado junto à  
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária  
da Universidade de Brasília

**Orientadora:** Profª Drª Márcia de Aguiar Ferreira

BRASÍLIA – DF  
JULHO/2019

Morais, Dannyele van Landuyt

Fraude do leite por adição de formol: avaliação de um teste rápido para detecção e efeito sobre bactérias ácido lácticas / Dannyele van Landuyt Moraes; orientação de Márcia de Aguiar Ferreira. – Brasília, 2019.

27 p. : il.

Trabalho de conclusão de curso de graduação – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2019.

## **Cessão de Direitos**

Nome do Autor: Dannyele van Landuyt Moraes

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Fraude do leite por adição de formol: avaliação de um teste rápido para detecção e efeito sobre bactérias ácido lácticas

Ano: 2019

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

Dannyele van Landuyt Moraes  
e-mail: [dannylanduyt@hotmail.com](mailto:dannylanduyt@hotmail.com)

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: MORAIS, Dannyele van Landuyt

Título: Efeito do período de armazenamento do leite na detecção de formol adicionado e no desenvolvimento da microbiota láctica

Trabalho de conclusão do curso de graduação em  
Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade  
de Agronomia e Medicina Veterinária da  
Universidade de Brasília

Aprovado em 15 / 07 / 19

Banca Examinadora

Profª. Drª. Márcia Ferreira de Aguiar	Instituição: UnB
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Profª. Drª. Paula Diniz Galera	Instituição: UnB
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Drª Sabrina dos Santos Costa Poggiani	Instituição: UnB
Julgamento: _____	Assinatura: _____

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, que me proporcionaram condições de estudo, que sempre me incentivaram e acreditaram no meu potencial, por todo carinho e compreensão.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia de Aguiar Ferreira, que me guiou com muita sabedoria e que sempre esteve disponível nas horas em que precisei. Por ser uma excelente professora que me inspirou a seguir a pesquisa nessa área.

À Jaqueline Lamounier e à Sabrina dos Santos Costa Poggiani por todo apoio, motivação, pela paciência e por se tornarem minhas amigas.

À Gabriela Barbosa e ao Leonardo Richard por me auxiliarem no desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu namorado Bruno, por todo o apoio emocional e companheirismo. Por fim, agradeço de todo coração à Adriane, Amanda, Carolina, Elidio, Luana e Lívia que se tornaram amigos para a vida toda.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	OBJETIVOS .....	4
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	5
3.1	Primeiro estudo .....	5
3.2	Segundo estudo .....	7
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	9
4.1	Primeiro estudo .....	9
4.2	Segundo estudo .....	12
5	CONCLUSÕES .....	16
6	REFERÊNCIAS .....	17

## Lista de Quadros e Tabelas

**Quadro 1:**Concentrações de formol adicionadas ao leite. .... 6

**Quadro 2:** Tratamentos para avaliação do tempo de armazenamento. .... 6

**Quadro 3:**Concentrações de formol adicionadas ao leite. .... 8

**Quadro 4:** Tratamentos para avaliação do tempo de armazenamento ..... 9

**Tabela 1:** Resultados das reações do teste Formfix2.0® na detecção de diferentes concentrações de formol adicionado ao leite. .... 10

**Tabela 2:** Contagens de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis* inoculados em leite, submetidos a diferentes concentrações de formol e armazenados por até 48 horas em refrigeração. .... 13

## Lista de figuras

- Figura 1:** Desempenho do teste rápido Formfix2.0®, sendo A o tempo 0, B tempo 24, C tempo 48, D tempo 72 e E tempo 96 horas. .... 11
- Figura 2:** Placas de contagem de *Lactococcus lactis* na concentração de 0,001% de formol. Onde, A indica o desenvolvimento no tempo 0, B no tempo 24 e C em 48 horas. .... 15
- Figura 3:** Placas de contagem de *Lactococcus lactis* na concentração de 0,005% de formol. Onde, A indica o desenvolvimento no tempo 0, B no tempo 24 e C em 48 horas. .... 15
- Figura 4:** Placas de contagem de *Lactobacillus rhamnosus* na concentração de 0,001% de formol. Onde, A indica o desenvolvimento no tempo 0, B no tempo 24 e C em 48 horas. .... 15
- Figura 5:** Placas de contagem de *Lactobacillus rhamnosus* na concentração de 0,5% de formol. Onde, A indica o desenvolvimento no tempo 0, B no tempo 24 e C em 48 horas. .... 16
- Figura 6:** Placas de contagem de *Lactobacillus rhamnosus* na concentração de 0,1% de formol. Onde, A indica o desenvolvimento no tempo 0, B no tempo 24 e C em 48 horas. .... 16



## RESUMO

O presente trabalho foi conduzido em dois estudos, o primeiro teve o objetivo de avaliar o efeito de diferentes tempos de armazenamento na detecção de formol por meio do teste rápido Formfix2.0® e comparar seu desempenho com a metodologia oficial preconizada atualmente. Para tanto, foi adicionado formol ao leite nas concentrações de 0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,03%, 0,05%, 0,1% e 0,5%, e todos os tratamentos foram testados nos tempos de zero, 24, 48, 72 e 96 horas. Os resultados obtidos demonstraram que a metodologia oficial se mostrou laboriosa, porém sensível para todas as concentrações e tempos analisados. Já o teste Formfix2.0® apresentou-se como uma alternativa de fácil execução, no entanto foi capaz de detectar a presença do formol apenas a partir da concentração de 0,01%, em todos os tempos. O segundo estudo buscou avaliar os efeitos do formol sobre o desenvolvimento de *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus rhamnosus*. Para tanto, alíquotas de leite foram inoculadas com isolados das duas cepas e foram submetidas a diferentes concentrações de formol (0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,1% e 0,5%). Os inóculos foram semeados após zero, 24 e 48 horas de armazenamento em temperatura de refrigeração e, então, incubados em 37°C por 24 horas. Ambos os isolados apresentaram alta resistência em concentrações de até 0,01% de formol, com destaque para o isolado de *Lactococcus lactis* que conseguiu se desenvolver em concentrações de 0,1% de formol, armazenado por 48 horas. Os resultados dos estudos demonstraram que o Formfix2.0® não apresenta o mesmo desempenho quando comparado com a metodologia oficial, porém pode ser indicado como teste de triagem tendo em vista a facilidade na execução. As cepas de BALs utilizadas apresentaram resistência ao formol, no entanto são necessários mais estudos para determinar os efeitos do formol sobre outros gêneros de BALs, além de avaliar a resistência desses micro-organismos a outras substâncias conservantes.

**Palavras-chave:** formaldeído; Formfix2.0®; fraude do leite; *Lactococcus lactis*; *Lactobacillus rhamnosus*.

## ABSTRACT

The present study was conducted in two studies, the first aimed to evaluate the effect of different storage times on formaldehyde detection by means of the Formfix2.0® rapid test and to compare its performance with the recommended official methodology. Formaldehyde was added to the milk at concentrations of 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.03%, 0.05%, 0.1% and 0.5%, and all treatments were tested in zero, 24, 48, 72 and 96 hours. The results obtained showed that the official methodology proved to be laborious, but sensitive for all concentrations and times analyzed. On the other hand, the Formfix2.0® test was presented as an alternative that was easy to perform; however, it was able to detect the presence of formaldehyde only from a concentration of 0.01% at all times. The second study aimed to evaluate the effects of formaldehyde on the development of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus rhamnosus*. For this purpose, milk aliquots were inoculated with isolates of the two strains and were submitted to different concentrations of formalin (0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.1% and 0.5%). The inoculum was sown after zero, 24 and 48 hours of storage at refrigeration temperature and then incubated at 37°C for 24 hours. Both isolates presented high resistance in concentrations of up to 0.01% of formaldehyde, with emphasis on the *Lactococcus lactis* isolate that was able to develop in concentrations of 0.1% of formaldehyde, stored for 48 hours. The results of the studies showed that Formfix2.0® does not present the same performance when compared to the official methodology, but it can be indicated as a screening test in view of its ease of execution. The strains of BALs used showed resistance to formaldehyde; however, further studies are needed to determine the effects of formaldehyde on other types of BALs, in addition to evaluating the resistance of these microorganisms to other preservative substances.

**Keywords:** formaldehyde; Formfix2.0®; milk fraud; *Lactococcus lactis*; *Lactobacillus rhamnosus*.

## 1 INTRODUÇÃO

O leite possui alto valor nutricional, composto em sua maioria por água, seguido de açúcares, lipídeos, proteínas, vitaminas e sais minerais. Além disso, apresenta elevada importância na economia do Brasil sendo que em 2017 a produção de leite brasileira foi de 35,1 bilhões de litros (EMBRAPA, 2018).

Entretanto, é um produto alvo de práticas fraudulentas amplamente difundidas no Brasil (MENDES et al., 2010; ROSA CAMPOS et al., 2011; SAMDRA, et al., 2013; MAREZE et al., 2015;).

A legislação brasileira é bem clara ao estabelecer que o leite não deve apresentar substâncias estranhas à sua composição, tais como agentes inibidores do crescimento microbiano, neutralizantes da acidez, reconstituintes da densidade ou do índice crioscópico. Se houver evidência ou suspeita de que um produto de origem animal represente risco à saúde pública ou tenha sido alterado, adulterado ou falsificado, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento deverá adotar, isolada ou cumulativamente, medidas cautelares que podem incluir até a suspensão das atividades, caso alguma indústria esteja envolvida (BRASIL, 2017a).

Em 2007, foi deflagrada a Operação Ouro Branco, na qual duas cooperativas de laticínios no estado de Minas Gerais foram acusadas de adicionar soro de leite, peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio ao leite longa vida integral. Em 2013, o Ministério Público desencadeou a “Operação Leite Compensado” no Rio Grande do Sul, na qual laticínios de grande porte foram acusados de comercializar leite com adição de água e ureia. Em 2014, aconteceu a chamada “Operação Leite Adulterado” I, II e III envolvendo os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul e mais uma vez, diversas fraudes foram constatadas como adição de peróxido de hidrogênio, soda cáustica, álcool etílico e citrato (ANVISA 2013).

Essas fraudes visam à obtenção de vantagens financeiras para os fraudadores, por produzirem aumento do volume e por mascararem qualidade microbiológica e físico-química insatisfatórias (CAVALETTI, 2013). Dentre as

fraudes mais comuns estão: a adição de água; adição de soro; os reconstituintes, como amido, sais e açúcares; os neutralizantes, tais como bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio; os conservantes, como peróxido de hidrogênio, formol, cloro e hipoclorito e os resíduos de antibióticos (KARTHEEK et al., 2011).

As substâncias conservantes são adicionadas ao leite com o intuito de eliminar ou reduzir o desenvolvimento de micro-organismos que causam alterações físico-químicas no leite, e têm efeito prejudicial na produção de derivados como diversos queijos e de leites fermentados, pois inibem o desenvolvimento das culturas lácticas necessárias para a sua fabricação (CAVALETTI, 2013).

Além do prejuízo para a indústria, os conservantes como o formol podem representar sérios riscos à saúde dos consumidores. A Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2004, classificou este composto como carcinogênico (Grupo 1), tumorogênico e teratogênico por produzir efeitos na reprodução em humanos e em estudos experimentais demonstraram ser também, para algumas espécies de animais. Os tipos de câncer associados ao formol são de nasofaringe, nasossinusal e há fortes evidências para leucemia (ANVISA 2013).

A ingestão de formol puro causa imediata e intensa dor na boca e faringe; dores abdominais com náuseas, vômitos e possível perda de consciência. Também podem ser observados sintomas como proteinúria, acidose, hematemese, hematúria, anúria, vertigem, coma e morte por falência respiratória. Ocasionalmente pode ocorrer diarreia, associada ou não à melena, pele pálida, fria e úmida além de sinais de choque como dificuldade de micção, convulsões e estupor. A ingestão também pode ocasionar inflamação e ulceração/coagulação com necrose na mucosa gastrintestinal, colapso circulatório e renal. Associam-se ainda, danos degenerativos no fígado, rins, coração e cérebro (ANVISA 2013).

As provas para detecção de fraudes são muito laboriosas e isso dificulta a realização rápida e na frequência determinada pela legislação. Por estes e outros motivos, várias fraudes passam despercebidas resultando no acesso dos consumidores a um produto adulterado e que apresenta risco à saúde (MAREZE J et al. 2015). A metodologia oficial para pesquisa de formol conforme o Manual de Procedimentos para Laboratórios – rede de laboratórios nacionais agropecuários (BRASIL, 2017 b) despende tempo para sua realização, requerendo a destilação do

leite adicionado de ácido fosfórico e posterior aquecimento do destilado com ácido cromotrópico.

O Formfix2.0® foi desenvolvido pela Macofren Tecnologias Químicas LTDA, para simplificar o processo de detecção de formol no leite e aperfeiçoar a primeira versão do Formfix®. É um reagente líquido incolor de odor forte que na presença de formol desenvolve a cor violeta, enquanto que na ausência do mesmo o leite não altera sua coloração. É um teste simples, prático e rápido de ser executado. O Formfix2.0® não foi alvo de estudos até o presente momento.

O leite é um excelente substrato para o desenvolvimento de vários grupos de micro-organismos, desejáveis e indesejáveis. Compondo a microbiota natural do leite e seus derivados, estão as bactérias ácido lácticas (BALs) (KONDYLI et al., 2012).

Tais bactérias são utilizadas como culturas iniciadoras em alimentos fermentados, possuem ação probiótica e também são conhecidas pela produção de várias substâncias antimicrobianas, potencialmente utilizadas na bioconservação de alimentos (ORTOLANI, 2010). No entanto, para que as BALs manifestem seus efeitos benéficos é necessário que estejam em concentração adequada nos alimentos durante todo o período de validade (COSTA et al., 2013).

Considerando os aspectos apresentados, o presente trabalho teve por objetivo analisar a sensibilidade do teste Formfix2.0® frente à diversas concentrações de formol em diferentes tempos de armazenamento, além de verificar a influência do formol no desenvolvimento de colônias de BALs.

## 2 OBJETIVOS

### Objetivo geral

- Avaliar o efeito de diferentes períodos de armazenamento na detecção de formol adicionado ao leite por meio do teste rápido Formfix2.0® e no desenvolvimento de bactérias ácido lácticas.

### Objetivos específicos

- Comparar o desempenho do teste rápido Formfix2.0® com a metodologia convencional na detecção de diferentes concentrações de formol adicionado ao leite refrigerado e armazenado por até 96 horas.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de formol sobre o desenvolvimento de *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus rhamnosus*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os estudos foram realizados no Laboratório de Análises de Leite e Derivados (LabLeite), da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV) da Universidade de Brasília (UnB), no período de janeiro a junho de 2019.

#### 3.1 Primeiro estudo: Detecção de formol adicionado ao leite

##### ***Origem das amostras e avaliação da qualidade***

Para o desenvolvimento do experimento foi utilizado leite integral Ultra Alta Temperatura (UAT), no volume aproximado de quatro litros. Como forma de se avaliar a conformidade das características físico-químicas do leite utilizado, além dos parâmetros estabelecidos pelo regulamento do leite UAT contidos na Portaria No. 370/1997 (BRASIL, 1997) como acidez titulável pelo método Dornic, teor de gordura extrato seco desengordurado e estabilidade da proteína, também foram avaliados os teores de proteína, lactose, e densidade, em equipamento ultrassônico EKOMILK®.

Ainda, determinou-se o índice crioscópico por meio do ponto de congelamento em crioscópio digital (LAKTRON®) e a atividade da enzima peroxidase, de acordo com o Manual de Procedimentos para Laboratórios (BRASIL, 2017 b). A atividade da fosfatase alcalina foi determinada usando kit de reagentes comercial (Bioclin – Quibasa Química Básica, Belo Horizonte – MG, Brasil).

##### ***Concentrações de formol e tratamentos***

Foi adicionado formol ao leite de forma a se obter diferentes concentrações (0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,03%, 0,05%, 0,1% e 0,5%), além do controle negativo (Quadro 1), a partir da fórmula  $C_i V_i = C_f V_f$ , onde:

$C_i$  = Concentração *inicial*

$V_i$  = Volume *inicial*

$C_f$  = Concentração *final*

$V_f$ = Volume *final*

**Quadro 1.** Concentrações de formol adicionadas ao leite.

<b>Concentração de formol</b>	<b>Volume de formol adicionado</b>
Leite não adulterado	400 mL de leite
0,001%	399,99 mL de leite + 0,01 mL de formol
0,005%	399,95 mL de leite + 0,05 mL de formol
0,01%	399,90 mL de leite + 0,10 mL de formol
0,03%	399,70 mL de leite + 0,30 mL de formol
0,05%	399,50 mL de leite + 0,50 mL de formol
0,1%	398,92mL de leite + 1,08 mL de formol
0,5%	394,60 mL de leite + 5,40 mL de formol

Em seguida, todas as concentrações foram submetidas aos tempos de armazenamento em refrigeração (máximo de 10°C) estabelecidos conforme contido no Quadro 2.

**Quadro 2.** Tratamentos para avaliação do tempo de armazenamento.

<b>Tratamentos</b>	<b>Tempo de armazenamento (horas)</b>
<b>T<sub>0</sub></b>	0 h
<b>T<sub>24</sub></b>	24 h
<b>T<sub>48</sub></b>	48 h
<b>T<sub>72</sub></b>	72 h
<b>T<sub>96</sub></b>	96 h

Para tanto, cada concentração foi distribuída em cinco frascos sendo que T0 foi avaliado imediatamente, e os demais tratamentos foram mantidos em temperatura de refrigeração e avaliados nos respectivos tempos.

### ***Deteção de formol***

Todas as concentrações de cada tratamento foram analisadas pela metodologia convencional (BRASIL,2017 b) que consiste em acidificar 100 mL de leite acrescido de 100 mL de água destilada, com 1,0 mL de ácido fosfórico. Em seguida, submeter 50 mL da mistura resultante ao processo de destilação; após,



1,0 mL do destilado deve ser transferido para tubo de ensaio e acrescido de 5,0 mL de ácido cromotrópico a 0,5%; na sequência, essa solução fica por 15 minutos em banho maria, em temperatura de ebulição, para observação da cor formada. O resultado positivo gera coloração violácea, ao passo que o resultado negativo gera coloração acastanhada. Foi realizada uma repetição para cada concentração e tratamento.

Para o teste rápido Formfix2.0 ® foram seguidas as instruções do fabricante que consiste na adição de 1,0 mL do reagente a 1,0 mL de leite. Após o tempo máximo de 5 minutos, o teste deverá acusar a presença ou ausência de formol. O resultado positivo produz coloração violeta, em contrapartida o resultado negativo não gera nenhuma alteração de cor. Cada tratamento foi submetido a três repetições.

Os resultados de todos os testes foram registrados e comparados entre si. O tempo de formação da cor do teste Formfix2.0 ®, assim como o período de desenvolvimento da coloração também foram avaliados.

### **3.2 Segundo estudo: Efeito do formol sobre bactérias ácido lácticas**

#### ***Origem das amostras***

Para o desenvolvimento do experimento foram utilizados *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus rhamnosus* isolados de leite de búfalas, estocados em caldo Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Vandhani Ind. Lbs Marg, Mumbai, Índia) e Glycerol (Glicerina bidestilada, CEATOX, São Paulo, Brasil), mantidos em freezer -80°C, e pertencem ao acervo de BALs do Laboratório de Análises de Leite e Derivados, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UnB.

#### ***Recuperação dos isolados de BAL e preparo do inóculos***

Inicialmente, realizou-se a recuperação das BALs em caldo MRS a 37°C por 48 horas. Após esse processo, com a finalidade de isolar colônias para preparação de inóculos, os isolados foram semeados em Ágar MRS e incubadas a 37° C por 48 horas.

Os inóculos foram preparados de forma a se obter contagens aproximadas de  $3,0 \times 10^8$  UFC/mL para as duas cepas, de acordo com a escala de *Mac Farland*. Em seguida, utilizou-se o método de diluições decimais seriadas com solução salina (NaCl) a 0,85 % até chegar em contagens de  $3,0 \times 10^6$  UFC/mL.

Adicionou-se, então, 3,0 mL do inóculo contendo  $3,0 \times 10^6$  UFC/mL a 300 mL de leite UAT desnatado, obtendo-se uma diluição de  $3,0 \times 10^4$  UFC/mL. Tal processo foi realizado tanto para *Lactococcus lactis* quanto para *Lactobacillus rhamnosus*.

A partir do leite adicionado do inóculo, foram feitas mais duas diluições seriadas de modo a se obter contagens de  $3,0 \times 10^3$  UFC/mL e  $3,0 \times 10^1$  UFC/mL. A fim de se obter o controle negativo, as duas diluições foram semeadas pelo método *pour plate* em meio MRS em duplicata e incubadas a 37° C por 24 horas.

#### **Adição de formol**

O leite adicionado do inóculo a  $3,0 \times 10^4$  UFC/mL foi distribuído em alíquotas de 20 mL; cada alíquota recebeu diferentes concentrações de formol (0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,1% e 0,5%) obtidas conforme descrito no primeiro estudo e resultando nos volumes contidos no Quadro 3.

**Quadro 3.** Concentrações de formol adicionadas ao leite.

<b>Concentração de formol</b>	<b>Volume de formol adicionado</b>
0,001%	20 mL de leite + 0,0005 mL de formol
0,005%	20 mL de leite + 0,002 mL de formol
0,01%	20 mL de leite + 0,005 mL de leite
0,1%	20 mL de leite + 0,05 mL de formol
0,5%	20 mL de leite + 0,27 mL de formol

Em seguida, todas as concentrações foram submetidas aos tempos de armazenamento em refrigeração (máximo de 10°C) estabelecidos conforme contido no Quadro 2, sendo que T0 foi semeado imediatamente.

**Quadro 4.** Tratamentos para avaliação do tempo de armazenamento.

Tratamentos	Tempo de armazenamento (horas)
T <sub>0</sub>	0 h
T <sub>24</sub>	24 h
T <sub>48</sub>	48 h

### ***Avaliação do desenvolvimento de BALs***

Levando em consideração o tempo de armazenagem estabelecido, cada concentração foi submetida a diluições decimais seriadas, resultando em inóculos de  $3,0 \times 10^3$  UFC/mL e  $3,0 \times 10^1$  UFC/mL, tanto de *Lactococcus lactis* quanto de *Lactobacillus rhamnosus*. Cada diluição foi semeada pelo método *pour plate* em ágar MRS, em duplicata, sendo incubadas por 24 horas a 37°C. Após, realizou-se as contagens dos microrganismos testados e os resultados foram comparados entre os diferentes tempos de armazenamento. Os resultados das contagens foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL).

Para minimizar os riscos de contaminação todos os processos descritos foram feitos em capela de fluxo laminar. Além disso, o leite utilizado foi submetido ao processo de esterilização laboratorial e semeado pelo método de plaqueamento por superfície com 0,1 mL para garantia de sua inocuidade.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Primeiro estudo**

Os resultados das análises físico-químicas comprovaram a integridade dos componentes do leite utilizado na pesquisa: densidade de 1,031 g/mL; acidez 14°D; crioscopia de -0,535 °H; teor de sólidos não gordurosos 8,7%; de sólidos

totais 11,8%; de gordura 3,1%; de proteínas totais 2,9%; e teor de lactose de 5,11%; fosfatase alcalina e peroxidase negativas e estável ao alizarol.

Os resultados obtidos na avaliação do reagente do Formfix2.0® estão contidos na Tabela 1 e foram registrados de acordo com o tempo de formação da cor violeta, que indica resultado positivo para a presença de formol, e a não alteração de cor ou leve alteração, que foram consideradas como resultados negativos.

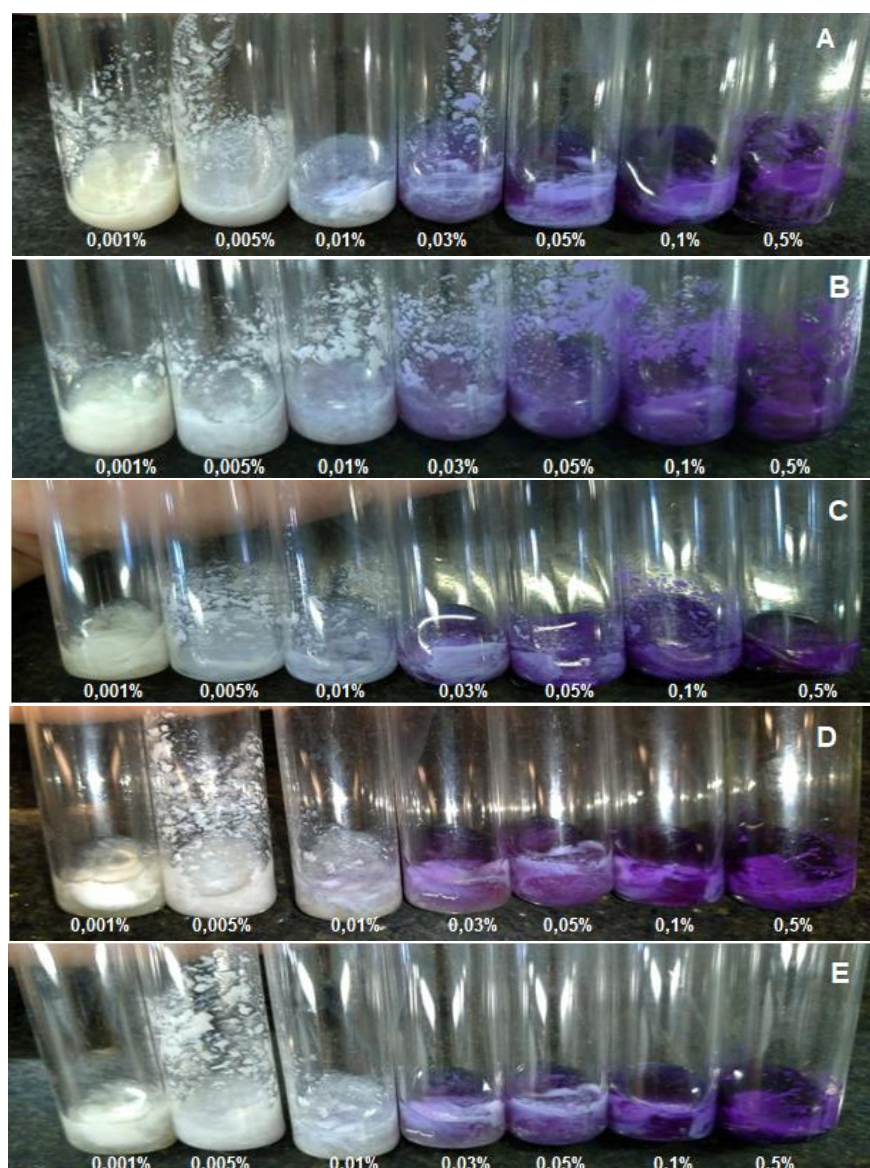
**Tabela 1:** Resultados das reações do teste Formfix2.0® na detecção de diferentes concentrações de formol adicionado ao leite.

<b>Concentração de formol</b>	<b>T0</b>	<b>T24</b>	<b>T48</b>	<b>T 72</b>	<b>T 96</b>
<b>0,001%</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>0,005%</b>	Positivo em 4 min.	Positivo em 5 min.	Positivo em 13 min.	Negativo	Negativo
<b>0,01%</b>	Positivo em 2 min.	Positivo em 2 min.	Positivo em 3 min.	Positivo em 3 min.	Positivo em 4 min.
<b>0,03%</b>	Positivo em 30 s.	Positivo em 1 min.	Positivo em 1 min.	Positivo em 2 min.	Positivo em 2 min.
<b>0,05%</b>	Positivo em Imediato	Positivo em 30 s.	Positivo em 1 min.	Positivo em 1 min. e 30 s.	Positivo em 1 min. e 30 s.
<b>0,1%</b>	Positivo em Imediato	Positivo em Imediato	Positivo em 30 s.	Positivo em 30 s.	Positivo em 50 s.
<b>0,5%</b>	Positivo em Imediato	Positivo em Imediato	Positivo em 30 s.	Positivo em 30 s.	Positivo em 30 s.

Min. corresponde a minutos, enquanto s. corresponde a segundos

A metodologia oficial para pesquisa de formol se mostrou sensível para todas as concentrações em todos os tempos analisados. Desta forma, indicando a persistência do formol em todos os tempos de refrigeração, conforme descrito por Pinheiro (2016).

O reagente Formfix2.0® ao entrar em contato com o leite precipita a proteína e isso acontece provavelmente, pela presença de ácido em sua composição. A reação positiva é facilmente distinguível do resultado negativo que não altera a cor do leite. Entretanto, foram observadas diferenças nas tonalidades de cor dos tratamentos contendo as diferentes concentrações de formol sendo que as tonalidades mais intensas corresponderam às maiores concentrações de formol (Figura 1).



**Figura 1:** Desempenho do teste rápido Formfix2.0®, sendo A o tempo 0, B tempo 24, C tempo 48, D tempo 72 e E tempo 96 horas.

O Formfix 2.0® foi capaz de identificar a presença de formol em todos os tempos de armazenamento apenas nas concentrações de 0,01%; 0,03%; 0,05%; 0,1% e 0,5%, e que quanto maior o período de armazenagem, maior era o tempo para o desenvolvimento da cor nos tratamentos contendo formol, porém sem exceder os cinco minutos indicados pelo fabricante.

Nos tratamentos contendo 0,005 % de formol, o teste indicou resultado falso negativo nos tempos de armazenamento de 72 e de 96 horas, sendo que em 48 horas de armazenamento a mudança de cor se tornou perceptível apenas após 13 minutos, ou seja, com oito minutos a mais da indicada pelo fabricante. Por outro lado, não foram observadas alterações de cor em nenhum dos tratamentos na concentração de 0,001% indicando resultado falso negativo.

#### **4.2 Segundo estudo**

Os resultados obtidos na inoculação dos isolados de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis* em diferentes concentrações de formol estão contidos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Contagens de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis* inoculados em leite, submetidos a diferentes concentrações de formol e armazenados por até 48 horas em refrigeração.

	Concentrações	T0 (UFC/mL)	T24 (UFC/mL)	T48 (UFC/mL)
<b><i>Lb.rhamnosus</i></b>	0%	23 (100%)	23 (100%)	23 (100%)
	0,001%	22 (95,65%)	20 (86,95%)	101(439,13%)
	0,005%	22 (95,65%)	13 (56,52%)	09 (39,13%)
	0,01%	18 (78,26%)	07 (30,43%)	05 (21,73%)
	0,1%	10 (43,47%)	0	0
	0,5%	0	0	0
<b><i>Lc. lactis</i></b>	0%	135 (100%)	135 (100%)	135 (100%)
	0,001%	160 (118,51%)	114 (84,44%)	68 (50,37%)
	0,005%	88 (65,18%)	101 (74,81%)	59 (43,70%)
	0,01%	83 (61,48%)	24 (17,77%)	08 (5,92%)
	0,1%	22 (16,29%)	03 (2,22%)	0
	0,5%	04 (2,96%)	0	0

Legenda: T0= tempo zero; T24= armazenamento por 24 h; T48= armazenamento por 48h

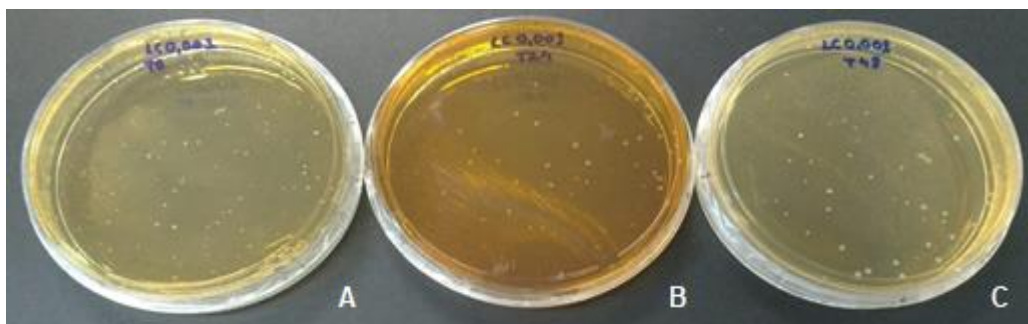
Com relação ao desenvolvimento do isolado de *Lb. rhamnosus* na concentração de 0,001% houve redução mínima do desenvolvimento em 24 horas, seguida por considerável aumento em 48 horas indicando que, o formol nessa concentração não interferiu no seu desenvolvimento. Nas concentrações de 0,005% e 0,01% a redução nas contagens foi maior no período de 48 horas, sugerindo que nessas concentrações o tempo de armazenamento exerceu influência na ação do formol sobre o micro-organismo. Por outro lado, nas maiores concentrações a ação do formol pode ser observada imediatamente após a adição nos inóculos, sendo que na concentração de 0,5% o efeito pode ser comparado a uma ação bactericida imediata (Tabela 2).

O isolado de *Lc. lactis* apresentou redução significativa no seu desenvolvimento nas concentrações de 0,001% e 0,005%, somente a partir do período de 48 horas. É importante ressaltar que na concentração de 0,005% houve leve aumento na contagem do isolado, no período de 24 horas, seguido por redução em 48 horas, indicando que nas primeiras 24 horas o formol não foi capaz de inibir o seu desenvolvimento. A partir da concentração de 0,01% observou-se maior redução nas contagens já a partir do T0, que foram aumentando nos tempos de 24 horas e de 48 horas de armazenamento. Apenas no T48h da concentração 0,1% e nos T24h e T48h da concentração 0,5% foi possível observar efeito comparado a bactericida sobre o *Lc. lactis*, sugerindo que esse isolado possa ser mais resistente aos efeitos do formol, quando comparado com *Lb. rhamnosus*.

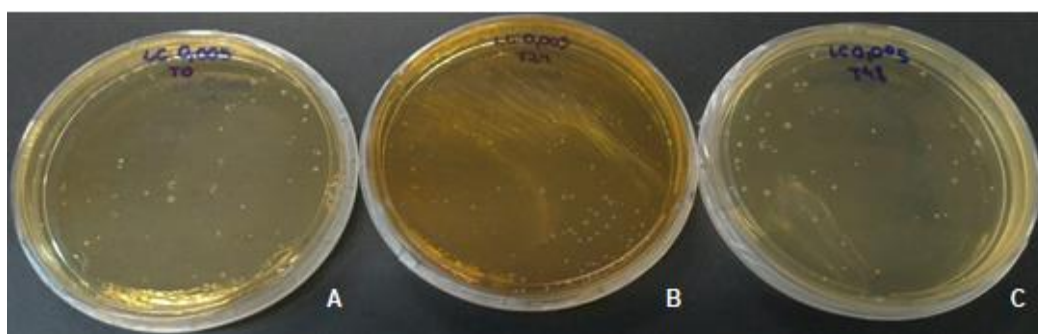
Bonefácio (2016) observou que as contagens de BALs reduziram significativamente a partir da adição de 0,005% de formol (de  $1,06 \times 10^5$  UFC/mL para  $4,60 \times 10^2$  UFC/mL) e que houve inibição total do desenvolvimento de tais micro-organismos nas concentrações de 0,01%, 0,05% e 0,1% de formol.

As figuras 2 e 3 mostram o desenvolvimento de *Lc lactis* submetido às concentrações de 0,001% e de 0,005% de formol e avaliados nos diferentes tempos de armazenamento (T0, T24h e T48h). As figuras de 4 a 6 mostram o desenvolvimento de *Lb. rhamnosus* quando submetido a concentrações de 0,001%, de 0,5% e de 0,1% de formol, nos diferentes tempos de armazenamento.

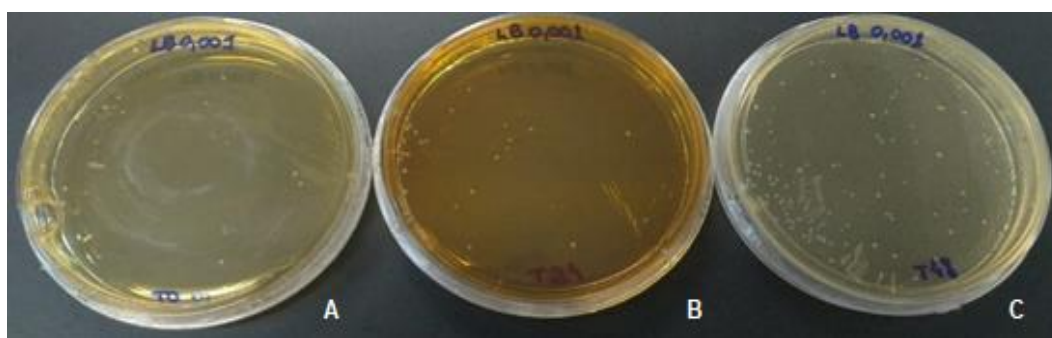




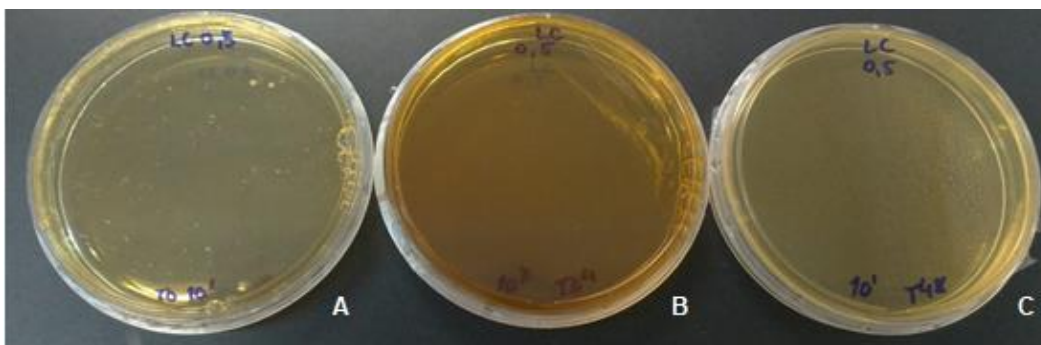
**Figura 2:** Placas de contagem de *Lactococcus lactis* na concentração de 0,001% de formol. Onde, A indica o desenvolvimento no tempo 0, B no tempo 24 e C em 48 horas.



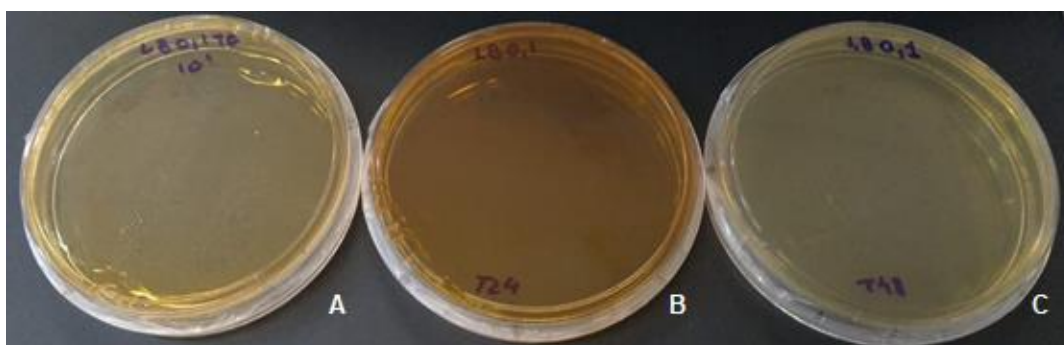
**Figura 3:** Placas de contagem de *Lactococcus lactis* na concentração de 0,005% de formol. Onde, A indica o desenvolvimento no tempo 0, B no tempo 24 e C em 48 horas.



**Figura 4:** Placas de contagem de *Lactobacillus rhamnosus* na concentração de 0,001% de formol. Onde, A indica o desenvolvimento no tempo 0, B no tempo 24 e C em 48 horas.



**Figura 5:** Placas de contagem de *Lactobacillus rhamnosus* na concentração de 0,5% de formol. Onde, A indica o desenvolvimento no tempo 0, B no tempo 24 e C em 48 horas.



**Figura 6:** Placas de contagem de *Lactobacillus rhamnosus* na concentração de 0,1% de formol. Onde, A indica o desenvolvimento no tempo 0, B no tempo 24 e C em 48 horas.

## 5 CONCLUSÕES

O reagente Formfix2.0® não apresenta o mesmo desempenho quando comparado com a metodologia oficial, pois detectou a presença de formol adicionado ao leite, nas concentrações a partir de 0,01%. Entretanto, a sua utilização poderia ser indicada como um teste de triagem tendo em vista a facilidade na execução e interpretação, assim reduzindo a possibilidade de que fraudes por adição de formol passem despercebidas.

*Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis* apresentaram resistência a diferentes concentrações de formol. São necessários mais estudos para determinar os efeitos do formol sobre outros gêneros de BALs, além de avaliar a resistência desses micro-organismos a outras substâncias conservantes.

## 6 REFERÊNCIAS

ANVISA. Esclarecimentos sobre os riscos à saúde das substâncias ureia e formol e sua adição ao leite. Informe técnico N° 53, 2013. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe%2BT%25C3%25A9c%2B53\\_risco%2Bde%2Bureia%2Be%2Bformol%2Bno%2Bleite.pdf/49915d61-509a-4782-a45c-2f1a5e7117f0](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe%2BT%25C3%25A9c%2B53_risco%2Bde%2Bureia%2Be%2Bformol%2Bno%2Bleite.pdf/49915d61-509a-4782-a45c-2f1a5e7117f0). Acesso em 10/06/2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA. Decreto n. 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal-RIISPOA. **Diário Oficial da União**. Brasília, Distrito Federal, 29 mar. 2017. Seção 1, p. 3

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA.. **MANUAL DE PROCEDIMENTOS PARA LABORATÓRIOS**. Brasília,DF: 2017. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/manual-finalizado-com-foto-dipoa-cgal-14\\_09\\_16.pdf/view](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/manual-finalizado-com-foto-dipoa-cgal-14_09_16.pdf/view) Acesso em: 1 jun. 2019.

BRASIL. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite UAT (UHT). **Diário Oficial da União**, Brasília, Distrito Federal, 08 set. 1997. Seção 1.p. 19700.

BONEFÁCIO, S. M. B. A. **Resíduos de formol em leite cru: Interferência de outras substâncias químicas na detecção e efeitos sobre a microbiota**. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal. 2016

CAVALETTI, L.C.S. **Capacidade de detecção de adulterações e suficiência das provas oficiais para assegurar a qualidade do leite pasteurizado** 96 f. Tese (ciência animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013

COSTA, H.H.S.; SOUZA, M.R.; ACÚRCIO, L.B.; CUNHA, A.F.; RESENDE, M.F.S.; NUNES, A.C. Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.65, n.6, p.1858-1866, 2013.

EMBRAPA. **Anuário leite 2018**. São paulo: Texto Comunicação Corporativa, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/36560390/anuario-do-leite-2018-e-lancado-na-agroleite>. Acesso em: 1 jun. 2019

KARTHEEK, M.; A.; SMITH, A.; KOTTAI MUTHU, A.; MANAVALAN, R. Determination of Adulterants in food: A Review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.3, n.2, p. 629-636, 2011.

KONDYLI, E.; SVARNAS, C.; SAMELIS, J.; KATSIARI, M.C. Chemical composition and microbiological quality of ewe and goat milk of native Greek breeds. **Small Ruminant Research**. v. 103, p. 194-199, 2012.

MAREZE, J. et al. Detecção de adulterações do leite pasteurizado por meio de provas oficiais. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 283-290, ago. 2015.

MENDES, C. G.; SAKAMATO, S. M.; SILVA, J. B. A.; JÁCOME, C. G. M.; LEITE, A. I. Análises físico-químicas e pesquisa de fraudes no leite informal comercializado no município de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira, Goiânia**, v. 11, n. 2, p. 349 – 356, abr/jun. 2010.

ORTOLANI, M.B.T.; YAMAZI, A.K.; MORAES, P.M.; VIÇOSA, G.N.; NERO, L.A. **Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*. Foodborne Pathogens and Disease**. v.7, n.2, p. 175-180, 2010.

PINHEIRO, P.S. **Estudo sobre a influência do tempo de armazenamento e da temperatura na detecção de formol adicionado ao leite**. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal. 2016

ROSA-CAMPOS, A. A.; ROCHA, J. E. S.; BORGIO, L. A.; MENDONÇA, M. A. Avaliação físico-química e pesquisa de fraude em leite pasteurizado integral tipo C produzido na região de Brasília, Distrito Federal. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, n.66, v.379, p.30-4. 2011.

SAMDRA, A. C. M. M.; SILVA, T. L.; PIVA, K. P.; SANDA, R. T.; ORSINE, J. V. C. CARACTERÍSTICAS DO LEITE CRU CONSUMIDO PELA POPULAÇÃO DE PIRES DO RIO - GO. **Revista Do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, 33(2), 127–134. 2013.